

日本国特許
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日
Date of Application:

2001年12月27日

出願番号
Application Number:

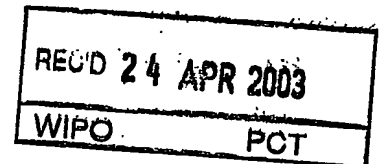
特願2001-398545

[ST.10/C]:

[JP2001-398545]

出願人
Applicant(s):

鐘淵化学工業株式会社

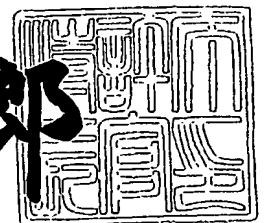


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 4月 1日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3022197

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4670

【提出日】 平成13年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 7/22
C07C 37/72

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県明石市小久保 1 2 0 - 5 5 - A 8 0 4

 【氏名】 矢島 麗嘉

【発明者】

 【住所又は居所】 兵庫県明石市小久保 5 1 - 2 - 2 0 5

 【氏名】 加藤 隆久

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府大阪市阿倍野区旭町 3 - 3 - 7 - 9 0 8

 【氏名】 神田 彰久

【発明者】

 【住所又は居所】 明石市相生町 1 - 1 0 - 3 6 - 6 0 1

 【氏名】 北村志郎

【発明者】

 【住所又は居所】 姫路市網干区和久 1 4 0 - 1 5

 【氏名】 上田恭義

【特許出願人】

 【識別番号】 000000941

 【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

 【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 005027

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

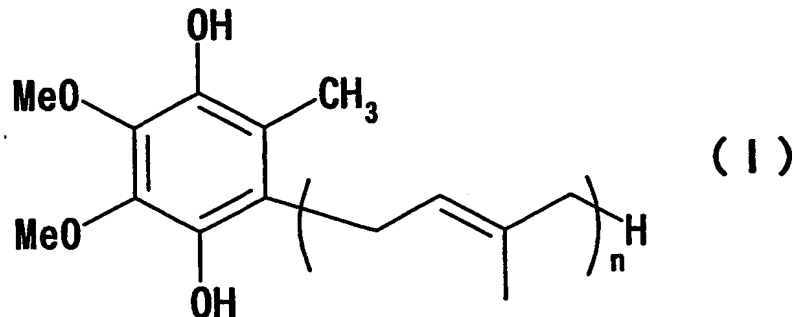
【書類名】 明細書

【発明の名称】 補酵素 Q_{10} の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 下記式 (I) ；

【化 1】



で表される還元型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出することを特徴とする還元型補酵素 Q_{10} の製造方法。

【請求項 2】 還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する抽出液を得る請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 3】 培養終了時の還元型補酵素 Q_{10} 生産量が $1 \mu g/mL$ である請求項 1 または 2 記載の製造方法。

【請求項 4】 培養は、 $15 \sim 45^{\circ}C$ 、且つ、 $pH 4 \sim 9$ で行われる請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5】 培養中、炭素源の濃度を還元型補酵素 Q_{10} の生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御する請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 6】 培養は、流加培養法により行われる請求項 5 記載の製造方法。

【請求項 7】 炭素源を他の成分とは別に培地に供給する請求項 6 記載の製造方法。

方法。

【請求項 8】培養は、好氣的に行われる請求項 1～7 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 9】抽出に際して、微生物細胞を破碎する請求項 1～8 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 10】細胞の破碎は、物理的処理、化学的処理、酵素的処理、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、または、原形質溶解により行われる請求項 9 記載の製造方法。

【請求項 11】細胞の破碎は、物理的処理、強酸を用いる酸処理、または、加熱処理により行われる請求項 9 記載の製造方法。

【請求項 12】細胞の破碎は、物理的処理により行われる請求項 9 記載の製造方法。

【請求項 13】物理的処理は、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレスまたはボールミルにより行われる請求項 12 記載の製造方法。

【請求項 14】細胞の破碎は、酸性～弱塩基性条件下に行われる請求項 9～13 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 15】還元型補酵素 Q_{10} の抽出に用いる有機溶剤として、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類またはニトリル類のうち少なくとも一種を用いる請求項 1～14 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 16】還元型補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞または該細胞破碎物の湿菌体または乾燥菌体から、親水性有機溶剤を用いて行われる請求項 1～14 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 17】親水性有機溶剤は、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノールまたは2-プロパノールである請求項 16 記載の製造方法。

【請求項 18】還元型補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞または該細胞破碎物の水性懸濁液から、疎水性有機溶剤を用いて行われる請求項 1～15 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 19】疎水性有機溶剤は、炭化水素類、脂肪酸エステル類またはエ

ーテル類である請求項 1 8 記載の製造方法。

【請求項 2 0】疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性有機溶剤を併用する請求項 1 8 または 1 9 記載の製造方法。

【請求項 2 1】疎水性有機溶剤は、炭化水素類であり、親水性有機溶剤は、アルコール類である請求項 2 0 記載の製造方法。

【請求項 2 2】疎水性有機溶剤は、脂肪族炭化水素であり、親水性有機溶剤は、炭素数 1 ～ 5 の 1 価アルコールである請求項 2 0 記載の製造方法。

【請求項 2 3】疎水性有機溶剤は、ヘキサンおよびヘプタンの少なくとも一種であり、親水性有機溶剤は、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールの少なくとも一種である請求項 2 0 記載の製造方法。

【請求項 2 4】抽出は、疎水性有機溶剤が 2 5 ～ 6 5 容量% 及び親水性有機溶剤 5 ～ 5 0 容量% の条件で行われる請求項 2 0 ～ 2 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 2 5】抽出は、連続抽出により行われる請求項 1 8 ～ 2 4 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 2 6】抽出は、酸性～弱塩基性条件下に行われる請求項 1 ～ 2 5 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 2 7】細胞の破碎及び／または抽出は、還元型補酵素 Q_{10} が酸化反応から防護された条件下に行われる請求項 1 ～ 2 6 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 2 8】酸化反応から防護された条件は、脱酸素雰囲気下、高塩濃度下、強酸存在下、酸化防止剤存在下、または、還元条件下である請求項 2 7 記載の製造方法。

【請求項 2 9】還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、試験管（内径 2 1 mm、全長 2 0 0 mm）を用いて、1 0 mL の培地 [（グルコース 2 0 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g）／L、pH 6. 0] 中で 2 5℃、7 2 時間、振とう培養（振幅 2 cm、3 1 0 往復／分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、窒素雰囲気下、該増殖液 1 0 容量部に対してイソプロパノール 3 容量部及び n-ヘキサン 1 8. 5 容量部の共存下にガラスビーズ（4 2 5 ～ 6 0 0

ミクロン) 10 容量部を用いて、3 分間激しく振とうして破碎することにより調製した疎水性有機溶剤相 (n-ヘキサン相) について HPLC により測定した場合に、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち 70 モル% 以上の比率で含有するものである請求項 1~28 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 30】還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、請求項 29 に記載の条件で HPLC により測定した場合に、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として $1 \mu\text{g/mL}$ 以上を示すものである請求項 29 記載の製造方法。

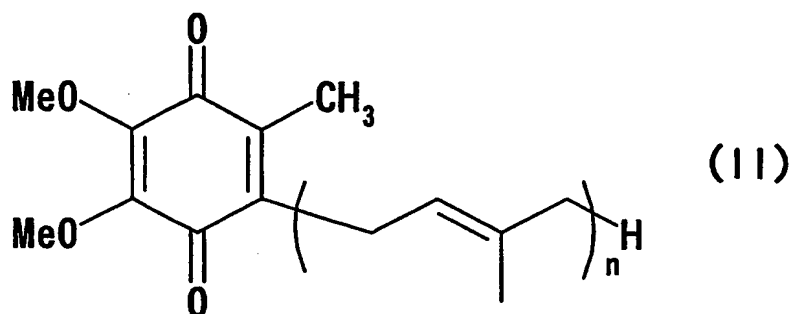
【請求項 31】微生物が、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アミノバクター (*Aminobacter*) 属、アグロモナス (*Agromonas*) 属、アシドフィラス (*Acidiphilium*) 属、ブレロミセス (*Bulleromyces*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、ブレブンジモナス (*Brevundimonas*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) キオノスファエラ (*Chionosphaera*) 属、カンジタ *Candida* 属、セリノステルス *Cerinosterus* 属、エキソフィアラ (*Exisophiala*) 属、エキソバシジウム (*Exobasidium*) 属、フィロミセス (*Fellomyces*) 属、フィロバシジエラ (*Filobasidiella*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、ゲオトリカム (*Geotrichum*) 属、グラフィオラ (*Graphiola*) 属、グロコノバクター (*Gluconobacter*) 属、コッコバエラ (*Kockovaella*) 属、クルツマノミセス (*Kurtzmanomyces*) 属、ララリア (*Lalaria*) 属、ロイコスפורジウム (*Leucosporidium*) 属、レギオネラ (*Legionella*) 属、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、ミコプラナ (*Mycoplasma*) 属、オースפורジウム (*Oosporidium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュドジマ (*Pseudozyma*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、ペトロミセス (*Petromyc*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、ロドスפורジウム (*Rhodospiridium*) 属、リゾモナス (*Rhizomonas*) 属、ロドビウム (*Rhodobium*) 属、ロドプラネス (*Rhodoplanes*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属、スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、スピングモナス (*Sphingomonas*) 属、スポトリクム (*Sporotrichum*) 属、シンポジオミコプシス (*Sympodiomyces*) 属、ステリグマト

スポリジウム (*Sterigmatosporidium*) 属、スフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属、タファリナ (*Tapharina*) 属、トレメラ (*Tremella*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、チレチアリア (*Tilletiaria*) 属、チレチア (*Tilletia*) 属、トリポスポリウム (*Tolyposporium*) 属、チレチオプシス (*Tilletiopsis*) 属、ウスチラゴ (*Ustilago*) 属、ウデニオミセス (*Udeniomyce*) キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属、または、キサントバクテリウム (*Xanthobacter*) 属、ペキロマイセス属 (*Paecilomyces*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属、プロトモナス属 (*Protomonas*)、オリゴモナス属 (*Oligomous*)、ハイホモナス属 (*Hyhomonas*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*) の微生物である請求項 1～30 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 32】得られた還元型補酵素 Q_{10} を、所望により精製した後、晶析を行って、還元型補酵素 Q_{10} 結晶を得る請求項 1～31 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 33】下記式 (II)；

【化 2】



で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち 70 モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換した後にこれを有機溶剤で抽出するか、或いは、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施した後に、還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換する

ことを特徴とする酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法。

【請求項34】培養終了時の還元型補酵素 Q_{10} 生産量が $1\mu\text{g}/\text{mL}$ である請求項33記載の製造方法。

【請求項35】培養は、 $15\sim 45^{\circ}\text{C}$ 、且つ、 $\text{pH}4\sim 9$ で行われる請求項33又は34に記載の製造方法。

【請求項36】培養中、炭素源の濃度を還元型補酵素 Q_{10} の生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御する請求項33～36のいずれかに記載の製造方法。

【請求項37】培養は、流加培養法により行われる請求項36記載の製造方法。

【請求項38】炭素源を他の成分とは別に培地に供給する請求項37記載の製造方法。

【請求項39】培養は、好氣的に行われる請求項33～38のいずれかに記載の製造方法。

【請求項40】抽出に際して、微生物細胞を破砕する請求項33～39のいずれかに記載の製造方法。

【請求項41】細胞の破砕は、物理的处理、化学的处理、酵素的処理、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、または、原形質溶解により行われる請求項40記載の製造方法。

【請求項42】細胞の破砕は、物理的处理により行われる請求項41記載の製造方法。

【請求項43】物理的处理は、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレスまたはボールミルにより行われる請求項42記載の製造方法。

【請求項44】補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞または該細胞破砕物の湿菌体または乾燥菌体から、親水性有機溶剤を用いて行われる請求項33～43のいずれかに記載の製造方法。

【請求項45】親水性有機溶剤は、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、1-プロパノールまたは2-プロパノールである請求項44記載の製造方法。

【請求項 4 6】補酵素 Q_{10} の抽出は、微生物細胞または該細胞破砕物の水性懸濁液から、疎水性有機溶剤を用いて行われる請求項 3 3 ~ 4 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 4 7】疎水性有機溶剤は、炭化水素類、脂肪酸エステル類またはエーテル類である請求項 4 6 記載の製造方法。

【請求項 4 8】疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性有機溶剤、を併用する請求項 4 6 または 4 7 記載の製造方法。

【請求項 4 9】疎水性有機溶剤は、炭化水素類であり、親水性有機溶剤は、アルコール類である請求項 4 8 記載の製造方法。

【請求項 5 0】疎水性有機溶剤は、脂肪族炭化水素であり、親水性有機溶剤は、炭素数 1 ~ 5 の 1 価アルコールである請求項 4 8 記載の製造方法。

【請求項 5 1】疎水性有機溶剤は、ヘキサンおよびヘプタンの少なくとも一種であり、親水性有機溶剤は、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールの少なくとも一種である請求項 4 8 記載の製造方法。

【請求項 5 2】抽出は、疎水性有機溶剤が 2 5 ~ 6 5 容量% 及び親水性有機溶剤 5 ~ 5 0 容量% の条件で行われる請求項 4 8 ~ 5 1 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5 3】抽出は、連続抽出により行われる請求項 4 6 ~ 5 2 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 5 4】還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、試験管（内径 2 1 mm、全長 2 0 0 mm）を用いて、1 0 mL の培地〔（グルコース 2 0 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g）/ L、pH 6. 0〕中で 2 5℃、7 2 時間振とう培養（振幅 2 cm、3 1 0 往復/分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、窒素雰囲気下、該増殖液 1 0 容量部に対してイソプロパノール 3 容量部及び n-ヘキサン 1 8. 5 容量部の共存下にガラスビーズ（4 2 5 ~ 6 0 0 ミクロン）1 0 容量部を用いて、3 分間激しく振とうして破砕することにより調製した疎水性有機溶剤相（n-ヘキサン相）について HPLC により測定した場合に、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち 7 0 モル% 以上の比率で含有するものである請求項 3 3 ~ 5 3 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項55】還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物は、請求項54に記載の条件でHPLCにより測定した場合に、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として $1\mu\text{g/mL}$ 以上を示すものである請求項54記載の製造方法。

【請求項56】微生物が、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アミノバクター (*Aminobacter*) 属、アグロモナス (*Agromonas*) 属、アシドフィラス (*Acidiphilium*) 属、ブレロミセス (*Bulleromyces*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、ブレブンジモナス (*Brevundimonas*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) キオノスファエラ (*Chionosphaera*) 属、カンジタ (*Candida*) 属、セリノステルス (*Cerinosterus*) 属、エキソフィアラ (*Exisophiala*) 属、エキソバシジウム (*Exobasidium*) 属、フィロミセス (*Fellomyces*) 属、フィロバシジエラ (*Filobasidiella*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、ゲオトリカム (*Geotrichum*) 属、グラフィオラ (*Graphiola*) 属、グロコノバクター (*Gluconobacter*) 属、コッコバエラ (*Kockovaella*) 属、クルツマノミセス (*Kurtzmanomyces*) 属、ララリア (*Lalaria*) 属、ロイコスפורジウム (*Leucosporidium*) 属、レギオネラ (*Legionella*) 属、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、ミコプラナ (*Mycoplasma*) 属、オースפורジウム (*Oosporidium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュドジマ (*Pseudozyma*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、ペトロミセス (*Petromyces*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、ロドスפורジウム (*Rhodosporidium*) 属、リゾモナス (*Rhizomonas*) 属、ロドビウム (*Rhodobium*) 属、ロドプラネス (*Rhodoplanes*) 属、ロドシュードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属、スפורジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、スピングモナス (*Sphingomonas*) 属、スポトリクム (*Sporotrichum*) 属、シンボジオミコプシス (*Sympodiomyces*) 属、ステリグマトスפורジウム (*Sterigmatosporidium*) 属、スフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属、タファリナ (*Tapharina*) 属、トレメラ (*Tremella*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、チレチアリア (*Tilletiaria*) 属、チレチア (*Tilletia*) 属、トリボスפורウム (*Tolyposporium*) 属、チレチオプシス (*Tilletiopsis*) 属、ウス

チラゴ (Ustilago) 属、ウデニオミセス (Udeniomyce) キサントフィロミセス (Xanthophyllomyces) 属、または、キサントバクテリウム (Xanthobacter) 属、ペキロマイセス属 (Paecilomyces) 属、アクレモニウム (Acremonium) 属、プロトモナス属 (Protomonas)、オリゴモナス属 (Oligomonas)、ハイホモナス属 (Hyphomonas)、リゾビウム属 (Rhizobium) の微生物である請求項 33～55 のいずれかに記載の製造方法。

【請求項 57】 得られた酸化型補酵素 Q_{10} を、所望により精製した後、晶析を行って、酸化型補酵素 Q_{10} 結晶を得る請求項 33～56 のいずれかに記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

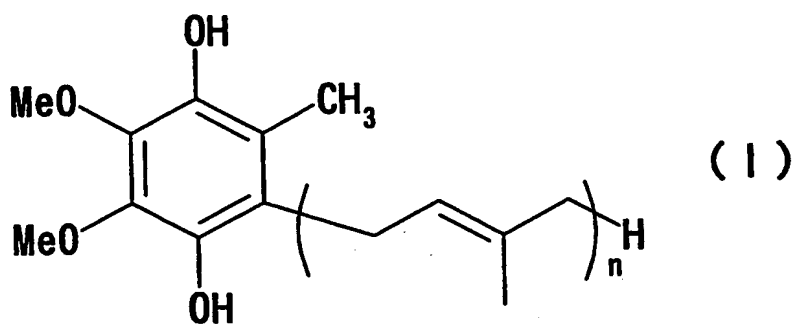
【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、下記式 (I) ；

【0002】

【化 3】

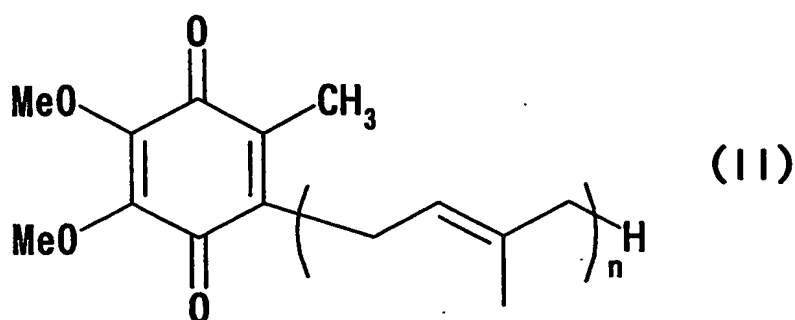


【0003】

で表される還元型補酵素 Q_{10} 、及び、下記式 (II) ；

【0004】

【化 4】



【0005】

で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法に関する。

【0006】

更に詳しくは、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を回収する、還元型補酵素 Q_{10} の製造方法に関する。

【0007】

また、前記微生物細胞または該細胞破碎物を酸化処理に付した後に酸化型補酵素 Q_{10} を回収するか、或いは、前記微生物細胞または該細胞破碎物から還元型補酵素 Q_{10} を回収した後に酸化処理に付す、酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法にも関する。

【0008】

【従来技術】

還元型補酵素 Q_{10} (I) 及び酸化型補酵素 Q_{10} (II) は、人の生体内の細胞中におけるミトコンドリアの電子伝達系構成因子であり、酸化的リン酸化反応における電子の運搬子として働くことによりATPの生成に関与している。

【0009】

従来から、酸化型補酵素 Q_{10} は、各種疾病に対して優れた薬理及び生理効果を示す物質として医薬品以外にも栄養補助食品や化粧品に使用される等、幅広い用途で用いられている。

【0010】

一方、還元型補酵素 Q_{10} は、これまであまり注目されていなかったが、近年、種々の用途において酸化型補酵素 Q_{10} よりも有効であるとの報告がなされるようになってきた。

【0011】

例えば、特開平10-330251号公報には、還元型補酵素 Q_{10} を有効成分とする、優れたコレステロール低下作用を有する抗高コレステロール血症剤、抗高脂血症剤ひいては動脈硬化症治療及び予防剤が開示されている。また、特開平10-109933号公報には、還元型補酵素 Q_{10} を含有する補酵素 Q_{10} を有効成分とする、経口吸収性に優れた医薬品組成物が開示されている。

【0012】

さらに、還元型補酵素 Q_{10} は抗酸化剤、ラジカルスカベンジャーとしても有効であり、アール・ストッカー (R.Stocker) らは、還元型補酵素 Q_{10} がヒトLDLの過酸化を α -トコフェロール、リコペンや β -カロチンより効率的に防止したことを報告している (Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America)、88巻、1646-1650頁、1991年)。

【0013】

生体内で、酸化型補酵素 Q_{10} と還元型補酵素 Q_{10} はある種の平衡関係にあり生体内に吸収された酸化型補酵素 Q_{10} /還元型補酵素 Q_{10} は相互に還元/酸化されることが知られている。

【0014】

還元型補酵素 Q_{10} の製法としては、酸化型補酵素 Q_{10} の製法と同様、化学合成法が考えられるが、その合成プロセスは煩雑・危険で、コスト高と予想される。また、化学合成法の場合は、安全性が懸念される(Z)-異性体の副生・混入 (Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q)、3巻、19項-30項、1981)を最小化する必要もあるであろう。酸化型補酵素 Q_{10} は、ヨーロッパ局

方においては、(Z) - 異性体の含有量が 0. 1 % 以下でなければならないと規定されている。

【 0 0 1 5 】

還元型補酵素 Q_{10} の別の製法として、微生物細胞を利用する方法、すなわち、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物から還元型補酵素 Q_{10} を分離・回収する方法も考えられるが、上記微生物細胞により生産される還元型補酵素 Q_{10} は多くの酸化型補酵素 Q_{10} を含んでおり、既知の方法を用いる還元型補酵素 Q_{10} の分離・回収はコスト高である。

【 0 0 1 6 】

微生物細胞中に還元型補酵素 Q_{10} が存在することを記載したものとしては、例えば、以下の細菌の例が知られている。

1) 光合成細菌の培養菌体において、還元型補酵素 Q_{10} が全補酵素 Q_{10} のうち、少ない場合で 5 ~ 1 0 重量%、多い場合で 3 0 ~ 6 0 重量% 存在すると記載した例 (特開昭 5 7 - 7 0 8 3 4 号公報)。

2) シュードモナス属菌体を、水酸化ナトリウム及びピロガロールの存在下に、有機溶剤で加熱抽出した後、5 % ハイドロサルファイトソーダ水で処理し、更に脱水濃縮してアセトン可溶部を採取することにより、還元型補酵素 Q_{10} を含む油状物を取得した例 (特開昭 6 0 - 7 5 2 9 4 号公報)。

【 0 0 1 7 】

上記 1) 及び 2) はいずれも、得られた還元型補酵素 Q_{10} と酸化型補酵素 Q_{10} の混合物、或いは、還元型補酵素 Q_{10} を、更に酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換することを目的としたものであり、還元型補酵素 Q_{10} は酸化型補酵素 Q_{10} 製造における中間物質として記載されているにすぎない。

【 0 0 1 8 】

上記 1) は、光合成細菌を用いており、培養が煩雑であるうえ、上記微生物細胞においては、還元型補酵素 Q_{10} の製造を目的とした場合、全補酵素 Q_{10} 中の還元型補酵素 Q_{10} の比率は十分とは言えない。

【 0 0 1 9 】

上記 2) は、ヘキサン相中に含まれる酸化型補酵素 Q_{10} を還元剤であるハイド

ロサルファイトソーダで還元型補酵素 Q_{10} に変換する操作（特開昭57-70834号公報実施例1を参照）を含んでおり、微生物細胞中の、全補酵素 Q_{10} 中の還元型補酵素 Q_{10} の比率は明らかでない。

【0020】

また、上記1)及び2)においては、培養における補酵素 Q の生産量は記載されていない。

【0021】

以上のように、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞はこれまで報告されておらず、ましてや還元型補酵素 Q_{10} を工業的規模で発酵生産、即ち、微生物を培養して還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} 中高い比率で含有する微生物細胞を得、還元型補酵素 Q_{10} を回収することにより、高純度の還元型補酵素 Q_{10} を得た例も知られていない。

【0022】

このような状況において、微生物を培養して、還元型補酵素 Q_{10} 比率の高い補酵素 Q_{10} を多量に得る方法を見いだせば、還元型補酵素 Q_{10} の極めて有利な製造法となりうる。

【0023】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞を培養し、該微生物細胞から還元型補酵素 Q_{10} を好適に回収することにより、還元型補酵素 Q_{10} を安全且つ効率的に工業的規模で生産する方法を提供することにある。

【0024】

更に、本発明の目的は、還元型補酵素 Q_{10} を高い比率で含有する微生物細胞を培養し、該微生物細胞から得られた還元型補酵素 Q_{10} を、酸化型補酵素 Q_{10} 製造における中間物質として、これを酸化することにより、簡便な操作で酸化型補酵素 Q_{10} を製造する方法を提供することにもある。

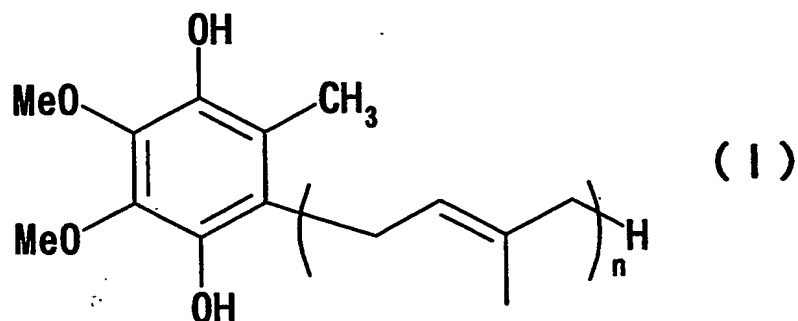
【0025】

【課題を解決するための手段】

本発明は、下記式(I)；

【 0 0 2 6 】

【化 5】



【 0 0 2 7 】

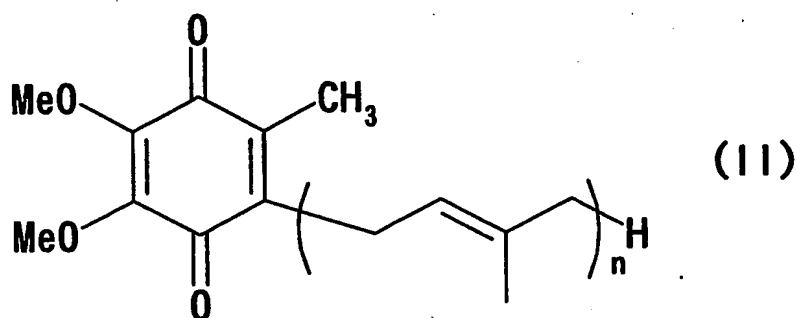
で表される還元型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出することを特徴とする還元型補酵素 Q_{10} の製造方法である。

【 0 0 2 8 】

本発明は、また、下記式 (II) ；

【 0 0 2 9 】

【化 6】



【 0 0 3 0 】

で表される酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法であって、炭素源、窒素源、リン源及び

微量栄養素を含んでなる培地中で、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養することによって、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得、必要に応じて該微生物細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換した後にこれを有機溶剤で抽出するか、或いは、生産された還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施した後に、還元型補酵素 Q_{10} を酸化して酸化型補酵素 Q_{10} に変換することを特徴とする酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法でもある。

【0031】

本発明の方法によれば、微生物の培養、還元型補酵素 Q_{10} の回収という非常に簡便な操作によって、還元型補酵素 Q_{10} を工業的規模で安価に製造することができる。また、酸化型補酵素 Q_{10} についても、簡便な操作によって製造することができる。さらに微生物によって生産されるこれらの補酵素 Q_{10} は、基本的に(Z)-異性体を含まず、肉、魚等に含まれるものと同じ(a11-E)-異性体を得ることができる。

【0032】

【発明の実施の形態】

本発明では、まず、還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物を培養し、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の比率で含有する微生物細胞を得る(発酵)。

【0033】

全補酵素 Q_{10} 中、上記のような高い比率で還元型補酵素 Q_{10} を含有する微生物細胞は、基本的に、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の比率で生成しうる微生物を使用することにより達成される。

【0034】

微生物が、全補酵素 Q_{10} のうち、いかなる比率で還元型補酵素 Q_{10} を生成しうるかは、例えば、試験管(内径21mm、全長200mm)を用いて、微生物を10mLの培地[(グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g)/L、pH6.0]中で25℃、72時間振とう培養(振幅2cm

、310往復/分)する方法により評価することができる。

【0035】

工業的規模での発酵生産における好ましい培養条件については後述するが、上記の培養条件は、微生物がその能力として有する還元型補酵素 Q_{10} 比率を大きく誤りのない範囲で反映するように標準化するための一つの方法である。

【0036】

上記の培養条件下、還元型補酵素 Q_{10} が全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の含量を示す微生物細胞を本発明に用いるのが良い。尚、更に好ましくは、上記の培養条件下、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として、普通 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、好ましくは $2\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の生産能力を有する微生物を用いるのが良い。

【0037】

ここで、上記の還元型補酵素 Q_{10} 含有量、及び、全補酵素 Q_{10} 中の還元型補酵素 Q_{10} 比率は、微生物細胞を物理的に破碎した後、有機溶媒で抽出してHPLC分析を行うことにより確認できる。具体的には、以下の手順により測定される。

- 1) 微生物増殖液を必要に応じて濃縮し、10容量部をネジ口試験管(内径16.5mm、全長130mm)に移し、ガラスビーズ(425~600ミクロン; SIGMA社製)10容量部を加える。
- 2) 窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部を加える。
- 3) 窒素雰囲気下、3分間激しく振とうすることにより、微生物細胞の破碎及び抽出を行う。
- 4) 得られた疎水性有機溶剤相(n-ヘキサン相)を減圧下にエバポレート(バス温:40℃)し、HPLCにより分析する。

【0038】

カラム: YMC-Pack 4.6×250mm (YMC. Co., Ltd. 製)

移動相: メタノール/n-ヘキサン=85/15

流速: $1\text{mL}/\text{min}$

検出：275 nm

保持時間：還元型補酵素Q₁₀ 13.5 min

酸化型補酵素Q₁₀ 22.0 min

上記測定方法は、得られた結果が還元型補酵素Q₁₀含有量及び全補酵素Q₁₀中の還元型補酵素Q₁₀比率を極力正しく反映するように、且つ、最低限保証しうる還元型補酵素Q₁₀含量及び比率を標準化するために与えられる。この方法は、本発明者らの幾つかの実験により、実施するのが容易且つ適切な方法であることが見出されたものである。

【0039】

本発明で用いる上記還元型補酵素Q₁₀生産微生物としては、細菌、酵母、カビのいずれも制限無く使用することができる。上記微生物として、具体的には、例えば、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、アセトバクター (*Acetobacter*) 属、アミノバクター (*Aminobacter*) 属、アグロモナス (*Agromonas*) 属、アシドフィラス (*Acidiphilium*) 属、ブレロミセス (*Bulleromyces*) 属、ブレラ (*Bullera*) 属、ブレブンジモナス (*Brevundimonas*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) キオノスファエラ (*Chionosphaera*) 属、カンジタ *Candida* 属、セリノステルス *Cerinosterus* 属、エキソフィアラ (*Exisophiala*) 属、エキソバシジウム (*Exobasidium*) 属、フィロミセス (*Fellomyces*) 属、フィロバシジエラ (*Filobasidiella*) 属、フィロバシジウム (*Filobasidium*) 属、ゲオトリカム (*Geotrichum*) 属、グラフィオラ (*Graphiola*) 属、グロコノバクター (*Gluconobacter*) 属、コッコバエラ (*Kockovaella*) 属、クルツマノミセス (*Kurtzmanomyces*) 属、ララリア (*Lalaria*) 属、ロイコスポリジウム (*Leucosporidium*) 属、レギオネラ (*Legionella*) 属、メチロバクテリウム (*Methylobacterium*) 属、ミコプラナ (*Mycoplasma*) 属、オースポリジウム (*Oosporidium*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、シュドジマ (*Pseudozyma*) 属、パラコッカス (*Paracoccus*) 属、ペトロミセス (*Petromyc*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodosporidium*) 属、リゾモナス (*Rhizomonas*) 属、ロドビウム (*Rhodobium*) 属、ロドプラネス (*Rhodoplanes*) 属、ロドシ

ユードモナス (*Rhodopseudomonas*) 属、ロドバクター (*Rhodobacter*) 属、スポロボロミセス (*Sporobolomyces*) 属、スポリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、サイトエラ (*Saitoella*) 属、シゾサッカロミセス (*Schizosaccharomyces*) 属、スピングモナス (*Sphingomonas*) 属、スポトリクム (*Sporotrichum*) 属、シンボジオミコプシス (*Sympodionomycopsis*) 属、ステリグマトスポリジウム (*Sterigmatosporidium*) 属、スフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属、タファリナ (*Tapharina*) 属、トレメラ (*Tremella*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、チレチアリア (*Tilletiaria*) 属、チレチア (*Tilletia*) 属、トリボスポリウム (*Tolyposporium*) 属、チレチオブシス (*Tilletiopsis*) 属、ウスチラゴ (*Ustilago*) 属、ウデニオミセス (*Udeniomyce*) キサントフィロミセス (*Xanthophyllomyces*) 属、キサントバクテリウム (*Xanthobacter*) 属、ペキロマイセス属 (*Paecilomyces*) 属、アクレモニウム (*Acremonium*) 属、プロトモナス属 (*Protomonas*)、オリゴモナス属 (*Oligomous*)、ハイホモナス属 (*Hyhomonus*)、リゾビウム属 (*Rhizobium*) の微生物を挙げることができる。培養の容易さや生産性の観点からは、細菌 (好ましくは非光合成細菌) 及び酵母が好ましい。

【0040】

還元型補酵素 Q_{10} 生産性微生物としては、上記微生物の野生株のみならず、例えば上記の微生物の還元型補酵素 Q_{10} 生合成に関与する遺伝子の転写及び翻訳活性、或いは発現蛋白質の酵素活性を改変、或いは改良した微生物も好ましく使用することができる。

【0041】

遺伝子の転写及び翻訳活性、或いは発現蛋白質の酵素活性を改変、或いは改良する手段としては、遺伝子組換え (自己遺伝子の改良、増幅、破壊や、外来遺伝子の導入及び該遺伝子の改良、増幅を含む) や、変異源による変異誘発が挙げられるが、変異源による変異誘発が好ましい。

【0042】

本発明に使用しうる、より好ましい微生物は、上記改変、或いは改良した微生物、好ましくは変異源により変異処理した微生物を前記増殖方法並びに測定方法により評価した場合に、還元型補酵素 Q_{10} が全補酵素 Q_{10} のうち75モル%以上

、好ましくは80モル%以上、より好ましくは85モル%以上、とりわけ90%以上の含量を示す微生物細胞である。工業規模での発酵生産においては、さらに、培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力として、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、特に $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、なかでも $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 、とりわけ $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の生産能力を有する微生物を用いるのが良い。

【0043】

変異誘発は単一の変異誘発として行うことができるが、2回以上の変異誘発を行うのが好ましい。各変異誘発段階により還元型補酵素 Q_{10} を生産する能力が改良されうることが見出されたからである。変異誘発処理にかけられる微生物細胞の候補としては、通常は、前記増殖方法並びに測定方法により評価した場合にできるだけ高い還元型補酵素 Q_{10} 生産能力を有するものが好ましいことは言うまでもない。

【0044】

変異誘発処理は、任意の適当な変異源を用いて行うことができる。「変異源」なる語は、広義の意味において、例えば変異源効果を有する薬剤のみならず、UV照射のような変異源効果を有する処理も含む。適当な変異源の例として、エチルメタンスルホネート、UV照射、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、プロモウラシルのようなヌクレオチド塩基類似体及びアクリジン類が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0045】

常用の変異誘発技法に従えば、変異誘発に続き、高い還元型補酵素 Q_{10} 生産能力を有する微生物細胞の適切な選択を行う。このためには、単一コロニーから作られた培養物の評価を、例えば、前記増殖方法並びに測定方法を用いて行うことである。還元型補酵素 Q_{10} の結晶は白色の固層又は無色の液相を形成するため、コロニーの選別時には、前記測定法により還元型補酵素 Q_{10} 生産能力の評価を好適に行うことができる。

【0046】

本発明の方において、工業的規模での発酵生産における還元型補酵素 Q_{10} の高い生産性は、部分的には、前記の還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モ

ル%以上の比率で含有する微生物細胞の使用により得られ、また、部分的には、以下に記載される培地当たりの還元型補酵素 Q_{10} の生産能力を高めるための好適な培養（発酵）条件の使用により得られる。そして特に、上記の好適な微生物細胞の使用と以下の好適な培養（発酵）条件の使用とを組み合わせるのが好ましい。

【0047】

培養は、通常、微生物の増殖に適した多量栄養素や微量栄養素を含んでなる培地中で行われる。上記栄養素は、例えば、炭素源（例えば、グルコース、シュークロース、マルトース、デンプン、コーンシロップ、糖蜜等の炭水化物；メタノール、エタノール等のアルコール）、窒素源（例えば、コーンスチープリカー、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、水酸化アンモニウム、尿素、ペプトン）、リン源（例えば、リン酸アンモニウム、リン酸）並びに微量栄養素（例えば、マグネシウム、カリウム、亜鉛、銅、鉄、マンガン、モリブデン、硫酸、塩酸等のミネラル；ビオチン、デスチオビオチン、ビタミンB1等のビタミン類；アラニン、ヒスチジン等のアミノ酸；酵母エキスやマルトエキス等のビタミン類を含有する天然原料等）からなるが、これらに制限されるものではなく、一般的に使用されるものを用いることができる。上記の栄養素は、適宜、組み合わせて用いられる。

【0048】

培養の温度は、通常、15～45℃、好ましくは20～37℃で行われる。15℃未満では、微生物の増殖速度が工業生産のために許容されるには低すぎる傾向があり、45℃を越える高温では、微生物の生存が傷害される傾向にある。

【0049】

培養のpHは、通常4～9、好ましくは5～8である。pH3以下および、pH10以上では微生物の増殖が阻害される傾向がある。

【0050】

工業規模での発酵生産においては、微生物の種類にもよるが、培養中、炭素源（生成したアルコールも含む）の濃度を、還元型補酵素 Q_{10} 生産能力に実質的に悪影響を及ぼさない濃度に制御するのが好ましい。培養液中の炭素源の濃度は、

通常 20 g/L 以下、好ましくは 5 g/L 以下、より好ましくは 2 g/L 以下となるように培養を制御するのが好ましい。

【0051】

炭素源の濃度制御のためには、流加培養法を採用するのが好ましい。pH、溶存酸素濃度(DO) 或いは残糖濃度等の培養管理指標に基づき、栄養源(特に炭素源)の供給を調節することにより、培養液中の炭素源濃度を制御することができる。栄養源の供給は、微生物の種類にもよるが、培養の当初から開始しても良いし、培養途中から開始してもよい。栄養源の供給は、連続的であっても良いし、断続的であってもよい。なお、栄養源の供給にあたっては、上記炭素源を他の成分から分離して培地に供給するのが好ましい。

【0052】

培養は、所望の還元型補酵素 Q_{10} の生産量に達した時点で終了することができる。培養時間は特に制限されないが、普通、 $20\sim 200$ 時間である。

【0053】

上記の培養は、通常、好氣的に行われる。ここで、「好氣的」なる語は、培養中に酸素の制限が生じないように酸素の供給が行われることを意味し、好ましくは、培養中に酸素の制限が実質的に生じないように酸素の供給が充分に行われることを意味する。培養は、通常は通気下、好ましくは通気攪拌下に行われる。

【0054】

上記のような微生物、並びに培養条件を用いることにより、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の微生物細胞を得ることができる。また、還元型補酵素 Q_{10} の生産量も、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、好ましくは $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上、さらに好ましくは $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上という高い値が得られる。

【0055】

次に、上記培養により生産された還元型補酵素 Q_{10} の回収について説明する。

【0056】

本発明において、工業的規模での還元型補酵素 Q_{10} の効率的な製造は、部分的には、上記の好適な培養によって可能となり、また、部分的には、以下の還元型

補酵素 Q_{10} の好適な回収操作によって可能となる。

【0057】

還元型補酵素 Q_{10} の回収は、上記培養で得られた微生物細胞からの有機溶剤を用いる抽出により行われる。

【0058】

抽出に際しては、所望により前記細胞を破碎することができる。細胞の破碎は、細胞中に生産・蓄積された還元型補酵素 Q_{10} の効率的な抽出に寄与する。言うまでもなく、細胞の破碎と抽出とを同時に行っても良い。

【0059】

上記微生物細胞の破碎は、以下の1つまたは幾つかの破碎方法を任意の順序で行うことにより行われる。破碎方法としては、物理的处理、化学的处理、酵素的处理の他、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、原形質溶解等を挙げることができる。

【0060】

なお、本発明の「破碎」においては、還元型補酵素 Q_{10} の抽出が可能となる程度に細胞壁等の表面構造が損傷を受ければよく、必ずしも微生物細胞が破れる或いは断片化される必要はない。

【0061】

上記物理的处理としては、例えば、高圧ホモジナイザー、超音波ホモジナイザー、フレンチプレス、ボールミル等の使用、或いは、これらの組み合わせを挙げることができる。

【0062】

上記化学的处理としては、例えば、塩酸、硫酸等の酸（好ましくは強酸）を用いる処理、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等の塩基（好ましくは強塩基）を用いる処理等やこれらの組み合わせを挙げることができる。

【0063】

上記酵素的処理としては、例えば、リゾチーム、ザイモリアーゼ、グルカナーゼ、リボザイム、プロテアーゼ、セルラーゼ等を用いる方法を挙げることができ、適宜こらを組み合わせて用いても良い。

【0064】

上記の細胞破碎処理は、細菌では必ずしも必要ではない場合もある。しかし、酵母やカビでは、通常、細胞破碎処理は必要であり、細胞が破碎されていない場合、細胞中に生産・蓄積された還元型補酵素 Q_{10} は効率的に回収されにくい。

【0065】

還元型補酵素 Q_{10} の抽出・回収の前処理としての細胞破碎方法としては、上記破碎方法の中でも、特に、物理的処理、化学的処理（特に酸処理、好ましくは強酸（例えば、水溶液中における pK_a が2.5以下の酸）により還元型補酵素 Q_{10} が酸化から防護された条件（特願2001-215804）下での酸処理）、酵素的処理、加熱処理、自己消化、浸透圧溶解、原形質溶解等を挙げることができ、好ましくは物理的処理、化学的処理（特に上記の強酸を用いる酸処理）や加熱処理、より好ましくは、破碎効率の点から物理的処理を挙げることができる。

【0066】

従来の細胞破碎並びに補酵素 Q_{10} の抽出方法、具体的には、水酸化ナトリウム及びピロガロールの存在下に有機溶剤で抽出する方法は、コスト、廃棄物処理、廃微生物（廃菌体）有効利用（タンパク質の回収等）時の安全性等の面で問題があった。しかし、本発明の細胞破碎方法、とりわけ物理的処理法は、中和により多量の塩を副生することがなく、廃棄物処理のみならず廃微生物（廃菌体）の有効利用の面からも好適な方法である。

【0067】

上記の細胞破碎に用いる微生物細胞は、培養液、培養液を濃縮したもの、培養液から微生物細胞を湿菌体として採取したもの、これらを洗浄したもの、湿菌体を溶剤（例えば、水、生理食塩水、緩衝液等も含む）に懸濁したもの、これらの乾燥菌体や乾燥菌体を溶剤（例えば、水、生理食塩水、緩衝液等も含む）に懸濁したもの等であってよいが、好ましくは微生物細胞の水性懸濁液であり、操作性等の面から、より好ましくは、培養液、培養液を濃縮したものやこれらを洗浄したものである。

【0068】

還元型補酵素 Q_{10} の抽出・回収に用いる前記微生物細胞または該細胞破碎物の

形態も、上記と同様、特に制限されず、微生物細胞または該細胞破砕物の湿菌体や乾燥菌体であってもよいが、好ましくは、微生物細胞または該細胞破砕物の水性懸濁液であり、より好ましくは培養液、培養液を濃縮及び／または洗浄したものやこれらの破砕液（いずれも水性懸濁液）である。

【 0 0 6 9 】

上記の微生物細胞または該細胞破砕物の懸濁液における菌体濃度は、特に制限されず、乾燥重量で普通 1 ～ 2 5 重量%にて行いうるが、経済的には 1 0 ～ 2 0 重量%であるのが好ましい。

【 0 0 7 0 】

このようにして得られる前記微生物細胞及び該細胞破砕物を、有機溶剤を用いる抽出に付すことによって、還元型補酵素 Q_{10} は回収される。

【 0 0 7 1 】

抽出に用いる有機溶剤としては、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、アルコール類、脂肪酸類、ケトン類、窒素化合物類（ニトリル類、アミド類を含む）、硫黄化合物類等を挙げることができる。

【 0 0 7 2 】

特に、還元型補酵素 Q_{10} の抽出に際しては、分子酸素による酸化から防護する観点から、炭化水素類、脂肪酸エステル類、エーテル類、及び、ニトリル類のうち少なくとも一種を抽出溶媒として用いるのが好ましく、なかでも、炭化水素類、脂肪酸エステル類が好ましく、炭化水素類が最も好ましい（特願 2 0 0 1 - 2 1 4 4 7 1）。

【 0 0 7 3 】

工業的規模での製造においては、酸素の完全な除去は極めて難しく、更に個々の操作に要する時間はラボスケールでの製造とは異なりかなり長時間になるために、残存する酸素が大きな悪影響を及ぼす。上記酸化は還元型補酵素 Q_{10} からの酸化型補酵素 Q_{10} の副生に直結する。従って、還元型補酵素 Q_{10} の抽出における上記酸化防護効果の高い有機溶剤の使用は、効率的な抽出を助成する。

【 0 0 7 4 】

炭化水素類としては、特に制限されないが、例えば、脂肪族炭化水素、芳香族

炭化水素、ハロゲン化炭化水素等を挙げることができる。特に、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素が好ましく、とりわけ、脂肪族炭化水素が好ましい。

【0075】

脂肪族炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。普通、炭素数3～20、特に炭素数5～12、とりわけ炭素数5～8のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、プロパン、ブタン、イソブタン、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、ノナン、2, 2, 5-トリメチルヘキサン、デカン、ドデカン、2-ペンテン、1-ヘキセン、1-ヘプテン、1-オクテン、1-ノネン、1-デセン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン、p-メンタン、シクロヘキセン等を挙げることができる。

ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、ノナン、2, 2, 5-トリメチルヘキサン、デカン、ドデカン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン、p-メンタン等が好ましく、特に、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン等が好ましい。

一般に、ヘプタン類、ヘプタンはもちろん、炭素数7を有するメチルシクロヘ

キサン等の異種ヘプタンやそれらの複数混合物が好ましく用いられる。通常、炭素数5のペンタン類（例えば、ペンタン等）、炭素数6のヘキサン類（例えば、ヘキサン、シクロヘキサン等）、炭素数7のヘプタン類（例えば、ヘプタン、メチルシクロヘキサン等）等が好ましく用いられるが、最も好ましくは、ヘプタン類（例えば、ヘプタン、メチルシクロヘキサン等であり、最も好ましくはヘプタンである）である。これらのうち、ヘプタン類は、上記酸化からの防護効果が特に高い傾向がある。

【0076】

溶媒芳香族炭化水素としては、特に制限されないが、普通、炭素数6～20、特に炭素数6～12、とりわけ炭素数7～10のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、ベンゼン、トルエン、キシレン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、エチルベンゼン、クメン、メシチレン、テトラリン、ブチルベンゼン、*p*-シメン、シクロヘキシルベンゼン、ジエチルベンゼン、ペンチルベンゼン、ジペンチルベンゼン、ドデシルベンゼン、スチレン等を挙げることができる。トルエン、キシレン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、エチルベンゼン、クメン、メシチレン、テトラリン、ブチルベンゼン、*p*-シメン、シクロヘキシルベンゼン、ジエチルベンゼン、ペンチルベンゼン等が好ましく、特に、トルエン、キシレン、*o*-キシレン、*m*-キシレン、*p*-キシレン、クメン、テトラリン等が好ましい。最も好ましくは、クメンである。

ハロゲン化炭化水素としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、非環状のものが好ましく用いられる。普通、塩素化炭化水素、フッ素化炭化水素、特に塩素化炭化水素が好ましい。炭素数1～6、特に炭素数1～4、とりわけ炭素数1～2のものが好適に用いられる。

具体例としては、例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 1-ジクロロエタン、1, 2-ジクロロエタン、1, 1, 1-トリクロロエタン、1, 1, 2-トリクロロエタン、1, 1, 1, 2-テトラクロロエタン、1, 1, 2, 2-テトラクロロエタン、ペンタクロロエタン、ヘキサクロロエタン、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、テトラクロロエチレン、1, 2-ジクロロプロパン、1, 2, 3-トリクロロプロ

ロバン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等を挙げることができる。ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、1, 1-ジクロロエタン、1, 2-ジクロロエタン、1, 1, 1-トリクロロエタン、1, 1, 2-トリクロロエタン、1, 1-ジクロロエチレン、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等が好ましく、特に、ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、クロロベンゼン、1, 1, 1, 2-テトラフルオロエタン等が好ましい。

【0077】

脂肪酸エステル類としては、特に制限されないが、例えば、プロピオン酸エステル、酢酸エステル、ギ酸エステル等を挙げることができる。特に、酢酸エステル、ギ酸エステルが好ましく、とりわけ、酢酸エステルが好ましい。特に制限されないが、一般に、エステル基としては、炭素数1～8のアルキルエステル又はアラルキルエステル、好ましくは炭素数1～6のアルキルエステル、より好ましくは炭素数1～4のアルキルエステルが好ましく用いられる。

プロピオン酸エステルの具体例としては、例えば、プロピオン酸メチル、プロピオン酸エチル、プロピオン酸ブチル、プロピオン酸イソペンチルを挙げることができる。

酢酸エステルの具体例としては、例えば、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸sec-ブチル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸sec-ヘキシル、酢酸シクロヘキシル、酢酸ベンジル等を挙げることができる。酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル、酢酸sec-ブチル、酢酸ペンチル、酢酸イソペンチル、酢酸sec-ヘキシル、酢酸シクロヘキシル等が好ましい。最も好ましくは、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸イソプロピル、酢酸ブチル、酢酸イソブチル等であり、とりわけ、酢酸エチルが好ましい。

ギ酸エステルの具体例としては、例えば、ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸イソプロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸sec-ブチル、

ギ酸ペンチル等を挙げることができる。ギ酸メチル、ギ酸エチル、ギ酸プロピル、ギ酸ブチル、ギ酸イソブチル、ギ酸ペンチル等が好ましい。最も好ましくは、ギ酸エチルである。

【0078】

エーテル類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。普通、炭素数3～20、特に炭素数4～12、とりわけ炭素数4～8のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、ジヘキシルエーテル、エチルビニルエーテル、ブチルビニルエーテル、アニソール、フェネトール、ブチルフェニルエーテル、メトキシトルエン、ジオキサン、フラン、2-メチルフラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル等を挙げることができる。ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、ジヘキシルエーテル、アニソール、フェネトール、ブチルフェニルエーテル、メトキシトルエン、ジオキサン、2-メチルフラン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、エチレングリコールジメチルエーテル、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル等が好ましく、特に、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、アニソール、ジオキサン、テトラヒドロフラン、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテル等が好ましい。最も好ましくは、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、アニソール等であり、とりわけ、メチルtert-ブチルエーテルが好ましい。

【0079】

アルコール類としては、環状、非環状を問わず、又、飽和、不飽和を問わず、

特に制限されないが、一般に、飽和のものが好ましく用いられる。普通、炭素数 1~20、特に炭素数 1~12、とりわけ炭素数 1~6、なかでも炭素数 1~5 の 1 価アルコールが好ましく、又、炭素数 2~5 の 2 価アルコールが好ましく、又、炭素数 3 の 3 価アルコールが好ましい。

【0080】

これらアルコール類の具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘプタノール、1-オクタノール、2-オクタノール、2-エチル-1-ヘキサノール、1-ノナノール、1-デカノール、1-ウンデカノール、1-ドデカノール、アリルアルコール、プロパルギルアルコール、ベンジルアルコール、シクロヘキサノール、1-メチルシクロヘキサノール、2-メチルシクロヘキサノール、3-メチルシクロヘキサノール、4-メチルシクロヘキサノール、1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール、1, 2-ブタンジオール、1, 3-ブタンジオール、1, 4-ブタンジオール、2, 3-ブタンジオール、1, 5-ペンタンジオール、グリセリン等を挙げることができる。

【0081】

1 価アルコールとしては、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、1-ヘプタノール、2-ヘプタノール、3-ヘ

ブタノール、1-オクタノール、2-オクタノール、2-エチル-1-ヘキサノール、1-ノナノール、1-デカノール、1-ウンデカノール、1-ドデカノール、ベンジルアルコール、シクロヘキサノール、1-メチルシクロヘキサノール、2-メチルシクロヘキサノール、3-メチルシクロヘキサノール、4-メチルシクロヘキサノール等が好ましく、特にメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール、1-ヘキサノール、2-メチル-1-ペンタノール、4-メチル-2-ペンタノール、2-エチル-1-ブタノール、シクロヘキサノール等が好ましく、なかでもメタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール等が好ましい。最も好ましくは、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール等であり、なかでも、2-プロパノールが好ましい。

【0082】

2価アルコールとしては、1, 2-エタンジオール、1, 2-プロパンジオール、1, 3-プロパンジオール等が好ましく、1, 2-エタンジオールが最も好ましい。3価アルコールとしては、グリセリンが好ましい。

【0083】

ケトン類としては、特に制限されず、普通炭素数3~6のものが好適に用いられる。具体例としては、例えば、アセトン、メチルエチルケトン、メチルブチルケトン、メチルイソブチルケトン等を挙げることができ、特にアセトン、メチルエチルケトンが好ましく、とりわけアセトンが好ましい。

【0084】

窒素化合物類としては、例えば、ニトロメタン、アセトニトリル、トリエチルアミン、ピリジン、ホルムアミド、N-メチルホルムアミド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドン等を挙げることができる。

【0085】

硫黄化合物類としては、例えば、ジメチルスルホキシド、スルホラン等を挙げることができる。

【0086】

脂肪酸類としては、例えば、ギ酸、酢酸、プロピオン酸等を挙げることができるが、ギ酸、酢酸が好ましく、最も好ましくは酢酸である。

【0087】

上記有機溶剤の中でも、沸点、粘性等の性質（例えば、溶解度を高めるための適度な加温ができ、且つ、湿体からの溶剤の乾燥除去や晶析濾液等からの溶剤回収の行いやすい沸点（1気圧下、約30～150℃）、室温での取り扱い時及び室温以下に冷却した時も固化しにくい融点（約0℃以上、好ましくは約10℃以上、より好ましくは約20℃以上）を持ち、粘性が低い（20℃において約10 c p 以下等））を考慮して選定するのが好ましい。

【0088】

溶剤中での還元型補酵素Q₁₀の酸化防護効果は、還元型補酵素Q₁₀の高濃度溶液において高まる傾向がある。還元型補酵素Q₁₀は、酸化防護効果の高い上記有機溶剤（例えば、炭化水素類、脂肪酸エステル類等）に対して高い溶解性を示し、この高い溶解性は、高濃度溶液での取り扱いを可能とし、酸化防護を助成する。還元型補酵素Q₁₀の酸化防護のための好ましい抽出時の濃度は、特に制限されないが、上記有機溶剤に対する還元型補酵素Q₁₀の濃度として、普通1重量%以上である。

【0089】

上記有機溶剤のうち、微生物細胞または該細胞破砕物の湿菌体や乾燥菌体から、還元型補酵素Q₁₀を抽出・回収するには、親水性有機溶剤を用いるのが好まし

い。具体的には、アセトン、アセトニトリル、メタノール、エタノール、2-プロパノール等を挙げることができる。

【0090】

また、上記有機溶剤のうち、微生物細胞または該細胞破砕物の水性懸濁液から、還元型補酵素 Q_{10} を抽出・回収するには、疎水性有機溶剤を用いるのが好ましく、これは微生物由来の水溶性物質の除去を助成する。疎水性有機溶剤の多くは、先述の酸化防護効果の高い有機溶剤であり、極めて好都合である。

【0091】

ところで、上記抽出操作において、微生物細胞または該細胞破砕物の水性懸濁液、特に該細胞破砕物の水性懸濁液、とりわけ物理的処理による該細胞破砕物の水性懸濁液から有機溶剤を用いて抽出する場合、一部タンパク質等の細胞成分の存在によりエマルジョンが形成されやすく、相分離が困難になる傾向があるので、上記エマルジョンの形成を抑制して、効率よく抽出することが重要となる。

【0092】

そのためには、抽出溶剤として、上記疎水性有機溶剤に加えて、補助的溶剤として親水性溶剤を併用するのが好ましい。
この場合、疎水性溶剤としては、特に制限されず、上述のものを使用できるが、好ましくは、炭化水素類、より好ましくは脂肪族炭化水素である。脂肪族炭化水素のなかでも、炭素数5～8のものが好適に用いられる。

【0093】

上記脂肪族炭化水素の具体例としては、例えば、ペンタン、2-メチルブタン、ヘキサン、2-メチルペンタン、2, 2-ジメチルブタン、2, 3-ジメチルブタン、ヘプタン、ヘプタン異性体（例えば、2-メチルヘキサン、3-メチルヘキサン、2, 3-ジメチルペンタン、2, 4-ジメチルペンタン）、オクタン、2, 2, 3-トリメチルペンタン、イソオクタン、シクロペンタン、メチルシクロペンタン、シクロヘキサン、メチルシクロヘキサン、エチルシクロヘキサン等を挙げることができ、特に好ましくは、ヘキサン、ヘプタン、メチルシクロヘキサンであり、最も好ましくは、ヘキサン、ヘプタンである。

【0094】

上記の疎水性溶剤と組み合わせて用いられる親水性溶剤としては、特に制限されず、上述のものを使用しうるが、好ましくは、アルコール類である。アルコール類のなかでも、炭素数1～5の1価アルコールが好適に用いられる。これらの具体例としては、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、1-ブタノール、2-ブタノール、イソブチルアルコール、tert-ブチルアルコール、1-ペンタノール、2-ペンタノール、3-ペンタノール、2-メチル-1-ブタノール、イソペンチルアルコール、tert-ペンチルアルコール、3-メチル-2-ブタノール、ネオペンチルアルコール等を挙げることができる、特に好ましくは、2-プロパノールである。

【0095】

上記の親水性溶剤と疎水性溶剤の使用量としては、抽出時の濃度として、制限はされないが、好ましくは親水性溶剤が5～50容量%、疎水性溶剤が25～65容量%の範囲である。

【0096】

還元型補酵素 Q_{10} の回収において、抽出時の温度は、特に制限されないが、普通0～60℃、好ましくは20～50℃の範囲である。

【0097】

抽出方法としては、回分抽出、連続抽出（好ましくは、向流多段抽出）のどちらの方法でも行うことができるが、連続抽出（好ましくは、向流多段抽出）が、生産性の面で特に好ましい。回分抽出における攪拌時間は、特に制限されないが、普通5分以上であり、連続抽出における平均滞留時間は、特に制限されないが、普通10分以上である。

【0098】

還元型補酵素 Q_{10} の回収に際しては、還元型補酵素 Q_{10} が分解しないように（例えば、酸化型補酵素 Q_{10} に酸化されないように）留意するのが好ましい。そのためには、上記の抽出（細胞破碎も含む）は、酸性～弱塩基性条件下、好ましくは酸性～中性条件下に行うのが好ましい。pHを指標とする場合は、接触時間にもよるが、pH10以下、好ましくはpH9以下、より好ましくはpH8以下、とりわけpH7以下である。以上により、実質的に酸化反応を防護しうるが、所

望によって、より厳密には、少なくとも上記の抽出、より好ましくは上記の細胞の破碎及び／または抽出は、還元型補酵素 Q_{10} が酸化反応から防護された条件下に行うのが好ましい。

【0099】

「酸化反応から防護された条件下」としては、例えば、脱酸素雰囲気下（窒素ガス、炭酸ガス、ヘリウムガス、アルゴンガス、水素ガス等の不活性ガス雰囲気下、減圧下、沸騰下等）（例えば、特願2001-215804など）；高塩濃度下、例えば、好ましくは、水相の塩類（例えば、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム等の無機塩）の濃度が約5%以上である条件下（特願2001-214482）；強酸（例えば、水溶液中における pK_a が2.5以下の酸）存在下、例えば、還元型補酵素 Q_{10} の1モルに対して強酸0.1モル%以上（特願2001-215804）が存在する条件下；酸化防止剤存在下、例えば、アスコルビン酸、クエン酸、それらの塩やエステル類の共存下（特願2001-312179）等を挙げることができる。また、還元条件下（酸化型補酵素 Q_{10} が還元型補酵素 Q_{10} に変換されうる条件）、例えば、次亜硫酸類等の還元剤との接触（例えば、特願2001-214471、2001-214475、2001-214482、2001-230620など）を妨げない。

【0100】

以上の培養（発酵）及び抽出によって、還元型補酵素 Q_{10} は、好適に生産及び回収される。好ましくは、還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} のうち70モル%以上、好ましくは75モル%以上の比率で含有する抽出液を得る。このようにして得られた還元型補酵素 Q_{10} を含有する抽出液を、所望によりカラムクロマトグラフィー、還元処理等により精製した後、晶析操作を用いて、高純度の還元型補酵素 Q_{10} 結晶を取得することができる。なお、この場合も、一連の操作は、上述した「酸化反応から防護された条件下に行うのが好ましい。

【0101】

本発明では、また、上記微生物細胞または該細胞破碎物を酸化処理に付した後、酸化型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出するか、或いは、前記微生物細胞または該細胞破碎物から還元型補酵素 Q_{10} を有機溶剤で抽出し、必要により精製処理を施

した後、これを酸化処理に付すことにより、酸化型補酵素 Q_{10} を製造することができる。

【0102】

上記酸化は、例えば、還元型補酵素 Q_{10} （好ましくは、上述した還元型補酵素 Q_{10} を含有する微生物細胞または該細胞破砕物の水性懸濁液や還元型補酵素 Q_{10} の抽出液等）と酸化剤（例えば、二酸化マンガン等）を混合し、例えば、室温（例えば、 30°C ）で30分以上処理することにより行うことができる。微生物細胞または該細胞破砕物を酸化処理に付した場合は、酸化型補酵素 Q_{10} の抽出操作を、上述の還元型補酵素 Q_{10} の抽出操作と同様に行うことができ、それにより酸化型補酵素 Q_{10} を効率よく回収することができる。尚、酸化型補酵素 Q_{10} の回収は、還元型補酵素 Q_{10} の回収において推奨される「酸化反応から防護された条件下」に行う必要性はなく、通常的安全操作等を配慮して実施すればよい。このようにして得られる酸化型補酵素 Q_{10} は、所望によりカラムクロマトグラフィー等による精製を施しても良く、最終的に晶析操作を用いて、高純度の酸化型補酵素 Q_{10} 結晶として取得することができる。

【0103】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は、これら実施例に限定されるものではない。

【0104】

（実施例1）

表1～3の各種補酵素 Q_{10} 生産微生物を、試験管（内径21mm、全長200mm）を用いて、10mLの培地〔（グルコース20g、ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g）/L、pH6.0〕中で 25°C 、72時間振とう培養（振幅2cm、310往復/分）し、得られた増殖液を必要に応じ濃縮し、窒素雰囲気下、該増殖液10容量部に対してイソプロパノール3容量部及びn-ヘキサン18.5容量部の共存下にガラスビーズ（425～600ミクロン）10容量部を用いて、3分間激しく振とうして細胞を破砕および抽出を行った。得

られたヘキサン相を減圧下にエバポレートし（40℃）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析して還元型補酵素 Q_{10} 比率、並びに、還元型補酵素 Q_{10} 生産量を調べた。

【0105】

HPLC条件

カラム：YMC-Pack 4. 6×250mm (YMC. Co., Ltd. 製

)

移動相：メタノール／n-ヘキサン＝85／15

流速：1mL／分

検出：UV275nm

結果を表1～3に示す。なお、還元型補酵素 Q_{10} 比率とは、還元型補酵素 Q_{10} 及び酸化型補酵素 Q_{10} のピークの面積及び両者のモル吸光係数の比（1：7.5）をもとに、酸化型補酵素 Q_{10} と還元型補酵素 Q_{10} の総和に対する還元型補酵素 Q_{10} の割合をモル百分率で表した値を意味する。

【0106】

【表1】

菌株名	上段:還元型補酵素Q10比率(%) 下段:還元型補酵素Q10生産量(μ g/ml)
アグロバクテリウム・ツメファシエンシス IFO 13263 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	82 7
アグロバクテリウム・ラジオバクター ATCC 4718 (<i>Agrobacterium radiobacter</i>)	78 7
アスペルギルス・クラバータス JCM 1718 (<i>Aspergillus clavatus</i>)	83 2
アセトバクター キシリナム IFO15237 (<i>Acetobacter xylinum</i>)	77 2
アミノバクター・アガノウエンシス JCM 7854 (<i>Aminobacter aganouensis</i>)	70 3
アグロモナス・オリゴトロフィカ JCM 1494 (<i>Agromonas oligotrophica</i>)	75 2
アシドフィラス・マルチボルム JCM 8867 (<i>Acidiphilium multivorum</i>)	73 3
ブレロミセス・アルバス IFO 1192 (<i>Bulleromyces albus</i>)	72 2
ブレラ・アルメニカ IFO 10112 (<i>Bullera armeniaca</i>)	85 7
ブレブンジモナス・ジミヌタ JCM 2788 (<i>Brevundimonas diminuta</i>)	82 5
クリプトコッカス・ラウレンティー IFO 0609 (<i>Cryptococcus laurentii</i>)	79 6
キオノスファエラ・アポバシジアリス CBS 7430 (<i>Chionosphaera apobasidialis</i>)	71 2
カンジタ・クルバータ ATCC 10567 (<i>Candida curvata</i>)	74 3
セリノステルス・ルテオアルバス JCM 2923 (<i>Cerinosterus luteoalbus</i>)	79 5
エキソフィアラ・アルカロフィラ JCM12519 (<i>Exisophiala alcalophila</i>)	77 3
エキソバシジウム・グラシル IFO7788 (<i>Exobasidium gracile</i>)	79 2
フィロミセス・フゾエンシス IFO 10374 (<i>Fellomyces fuzhouensis</i>)	70 2
フィロバシジエラ・ネオフォルマス CBS 132 (<i>Filobasidiella neoformans</i>)	88 2
フィロバシジウム・カプスロイゲナム CBS 1906 (<i>Filobasidium capsuloigenum</i>)	82 3
ゲオトリカム・カピタウム JCM 6258 (<i>Geotrichum capitatum</i>)	77 3
グラフィオラ・シリンドリカム IFO 6426 (<i>Graphiola cylindrica</i>)	75 4
クロコノバクター・スポキシダンス IFO 3257 (<i>Gluconobacter suboxydans</i>)	86 6
コッコバエラ・イムペラタエ JCM 7826 (<i>Kockovaella imperatae</i>)	78 2

【0107】

【表 2】

菌株名	上段:還元型補酵素Q10比率(%) 下段:還元型補酵素Q10生産量(μ g/ml)
クルツマノミセス・ネクタイレイ IFO 10118 (Kurtzmanomyces nectairei)	79 2
ララリア・セラシ CBS 275.28 (Lalaria cerasi)	75 2
ロイコスפורジウム・スコティー IFO 1212 (Leucosporidium scottii)	88 6
レギオネラ・アニーサ JCM 7573 (Legionella anisa)	73 3
メチロバクテリウム・エキトルグエンズ JCM 2802	72 2
ミコプラナ・ラモーサ JCM 7822 (Mycoplasma ramosa)	80 2
オースפורジウム・マルガリチフェルム CBS2531	76 2
シュードモナス・デニトリフィカンス IAM 12023 (Pseudomonas denitrificans)	85 8
シュードモナス・シルキリエンシス IAM 1092 (Pseudomonas shuykilliensis)	84 6
シュドジマ・アフィジス CBS 517.23 (Pseudozyma aphidis)	79 5
パラコッカス・デニトリフィカンス JCM 6892 (Paracoccus denitrificans)	83 5
ペトロミセス・アリアセウス IFO 7538 (Petromyces alliaceus)	72 2
ロドトルラ・グルティニス IFO 1125 (Rhodotorula glutinis)	79 7
ロドトルラ・ミヌタ IFO 0387 (Rhodotorula minuta)	74 8
ロドスפורジウム・ジオボバツム ATCC 1830 (Rhodosporidium diobovatum)	86 4
リゾモナス・スベリファシエンズ IFO 15212 (Rhizomonas suberifaciens)	82 2
ロドビウム・オリエンツ JCM 9337 (Rhodobium orientis)	80 2
ロドプラネス・エレガンス JCM9224 (Rhodoplanes elegans)	74 2
ロドシュードモナス・バルトリス JCM2524 (Rhodopseudomonas palustris)	90 6
ロドバクター・カプスレータス SB 1003 (Rhodobacter capsulatus)	95 6
スポロボロミセス・ホルサティカス IFO 1034 (Sporobolomyces holsaticus)	72 9
スポロボロミセス・パラロセウス IFO 0471 (Sporobolomyces pararoseus)	93 8
スポリジオボラス・ジョンソニー IFO 1840 (Sporidiobolus johnsonii)	73 7
サイトエラ・コンプリカタ IFO 10748 (Saitoella complicata)	97 9

【0108】

【表 3】

菌株名	上段:還元型補酵素Q10比率(%) 下段:還元型補酵素Q10生産量($\mu\text{g/ml}$)
シゾサッカロミセス・ポンペ IFO 0347 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	90 8
スピノモノナス・パラバウシモビリス IFO 15100 (<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i>)	78 7
スポトリウム・セルロフィリウム (<i>Sporotrichum cellulophilum</i>)	73 6
シンポジオミコプシス・パフィオペジリ JCM 8318 (<i>Sympodiomyces paphiopedili</i>)	80 6
ステリガマトスボリジウム・ボリモルファ IFO 10121	72 2
フィンゴモノナス・アドヘシバ JCM 7370 (<i>Sphingomonas adhesiva</i>)	80 3
タファリナ・カエルレスセンス CBS 351.35 (<i>Tapharina caerulescens</i>)	81 2
トレメラ・メセンテリカ ATCC 24438 (<i>Tremella mesenterica</i>)	89 3
トリコスポロン・クタネウム IFO 1198 (<i>Trichosporon cutaneum</i>)	95 8
チレチアリア・アノマラ CBS 436.72 (<i>Tilletiaria anomala</i>)	75 4
チレチア・カリエス JCM 1761 (<i>Tilletia caries</i>)	80 3
トリポスポリウム・ブラタム JCM 2006 (<i>Tolyposporium bullatum</i>)	73 4
チレチオプシス ワシントンネシス CBS 544 (<i>Tilletiopsis washintonensis</i>)	76 2
ウスチラゴ・エスケレンタ IFO 9887 (<i>Ustilago esculenta</i>)	78 2
ウデニオミセス・メガロスポラス JCM 5269 (<i>Udeniomyces megalosporus</i>)	87 2
キサントフィロミセス・デンドロロウス IFO 10129 (<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>)	84 2
キサントバクテリウム・フラブス JCM1204 (<i>Xanthobacter flavus</i>)	80 2

【0109】

(実施例 2)

ロードトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO1125を培地 (ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g、グルコース 20 g/L、pH 6.0) で好氣的に 25℃で 48 時間培養した。培養後の菌体を遠心分離により集菌し、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン を 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度になるように添加した pH 7 のリン酸緩衝液に懸濁した。25℃で 1 時間後、菌体を 0.9% NaCl 溶液で 5 回洗浄し、さらに 0.9% NaCl 溶液に

再懸濁した。この細胞懸濁液を適度に希釈し、上記培地の寒天プレートにコロニーを形成させた。単離した変異株の還元型補酵素 Q_{10} の生産量および還元型補酵素 Q_{10} の比率を実施例 1 と同様にして調べた。野生株と比較して生産量、還元型補酵素 Q_{10} の比率が高い株についてはさらに変異操作を繰り返した。その結果、10 回の変異を繰り返すことにより、 $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の生産能を示す変異株を得た。なお、この時の還元型補酵素 Q_{10} の比率は 80 モル%以上であった。

(実施例 3)

サイトエラ・コンプリカタ (*Saitoella complicata*) IF0 10748 を培地 (ペプトン 5 g、酵母エキス 3 g、マルトエキス 3 g、グルコース $20 \text{ g}/\text{L}$ 、 $\text{pH } 6.0$) で 25°C で 72 時間好氣的に 10 L 培養した。得られた菌体を、窒素ガスで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破碎圧力 80 MPa で 2 回破碎し、菌体破碎液を調製した。この菌体破碎液からイソプロパノール 30 容量部、ヘキサン 40 容量部の割合で抽出を 3 回繰り返すことにより、抽出液を得た。抽出率は 99% であり、還元型補酵素 Q_{10} の比率は 97 モル%であった。

(実施例 4)

ロードトルラ・グルティニス (*Rhodotorula glutinis*) IF01125 の変異株を培地 10 L (ペプトン 10 g、酵母エキス 5 g、マルトエキス 3 g、グルコース $20 \text{ g}/\text{L}$ 、 $\text{pH } 6.0$) で 25°C で好氣的に培養する際に、48 時間後よりグルコースを $0.4 \text{ g}/\text{h}$ の割合で 96 時間目までに流加した (流加グルコース量 190 g)。培地あたりの還元型補酵素 Q_{10} の生産量は $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上であり、還元型補酵素 Q_{10} の比率は 80 モル%以上であった。

(実施例 5)

実施例 3 で得られた抽出液をヘキサン溶液に置換し、シリカゲルを充填したカラムに吸着させ、 n -ヘキサン/ジエチルエーテル (9/1) 溶液で展開、溶出して還元型補酵素 Q_{10} を含む画分を得た。さらに、本画分を攪拌しながら 2°C まで冷却し、白色のスラリーを得た。以上すべての操作は窒素雰囲気下で行った。得られたスラリーを減圧ろ過し、湿結晶を上記展開液で洗浄し (洗浄に用いた溶媒の温度は 2°C)、湿結晶を減圧乾燥 ($20 \sim 40^\circ\text{C}$ 、 $1 \sim 30 \text{ mmHg}$) することにより、白色の乾燥結晶 81 mg を得た。得られた結晶の純度は 99.9

%、還元型補酵素Q₁₀の比率は90モル%であった。

(実施例6)

実施例3で得られた抽出液をn-ヘキサンに置換し、二酸化マンガンを50mg加え、30℃で30分攪拌した。この反応液を分取し、実施例5と同様にして精製すると高純度の酸化型補酵素Q₁₀が74mg得られた。

【0110】

(実施例7)

サイトエラ・コンプリカタ (*Saitoella complicata*) IF0 10748を培地(ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g、グルコース20g/L、pH6.0)で25℃、72時間好氣的に500mL培養した。得られた菌体を、窒素ガスで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破碎圧力80MPaで2回破碎し、菌体破碎液を調製した。破碎液中の還元型補酵素Qの割合は、酸化型も含めた全補酵素Qに対し、97%であった。この菌体破碎液200mLに対し、イソプロパノールおよびn-ヘキサンを、表4中の1回目抽出の欄で示す比率で、溶剂量の合計が500mLとなるよう混合し、温度40℃で30分間攪拌し、第1回目の抽出操作を行った。抽出終了後、10分間静置し、分離した上層を分離した。このときのトータル液量に対する下層(残渣)の比を、分離性の指標とし、界面位置として同表中に示した。

さらに、第2回目の抽出を行うため、残渣層の溶剤濃度を測定して、全体の溶剤比が、表4中の2回目の欄で示す比率になるよう、イソプロパノールと、ヘキサンを追加し、温度40℃で30分間攪拌した。ついで10分間静置し、同様に上層を分離し、残渣層の溶剤濃度を測定して、全体の溶剤比が、表4中の3回目の欄で示す比率になるようイソプロパノールと、ヘキサンを追加し、温度25℃で30分間攪拌し、第3回目の抽出操作とした。

【0111】

第1回、第2回、第3回のそれぞれの段階で分離された上層中に含まれる還元型補酵素Qの量の、抽出操作を行う前の菌体破碎液または抽出残渣中に含まれる還元型補酵素Qの量に対する比を、それぞれの段階での還元型補酵素Qの抽出率とし、その計算結果を表中に示した。また、第2回、第3回通算での補酵素Qの

抽出率も示した。いずれの段階においても、静置分離性は良好であり、3回の抽出を行った場合の通算抽出率は90%以上と、高い回収率を示した。特に、イソプロパノール濃度を30%以上とした場合は、99%以上の高い回収率となった。

【0112】

【表4】

		溶剤割合(vol%)		界面位置	抽出率(%)	
		イソプロパノール	ヘキサン		各回抽出率	通算抽出率
Case1	1回目	18.8	52.7	0.492	73.6	73.6
	2回目	19.0	52.4	0.624	47.6	86.2
	3回目	29.7	41.7	0.645	55.5	93.8
Case2	1回目	31.3	40.2	0.499	90.7	90.7
	2回目	37.7	33.7	0.549	83.7	98.5
	3回目	40.6	30.9	0.565	40.1	99.1
Case3	1回目	31.3	40.2	0.526	89.0	89.0
	2回目	34.1	37.3	0.553	85.8	98.3
	3回目	36.8	34.6	0.555	46.6	99.1
Case4	1回目	31.3	40.2	0.526	89.0	89.0
	2回目	34.1	37.3	0.553	85.8	98.3
	3回目	42.4	29.0	0.644	50.0	99.0
Case5	1回目	31.3	40.2	0.526	89.0	89.0
	2回目	40.1	31.4	0.595	88.1	98.6
	3回目	40.7	30.7	0.593	45.3	99.1
Case6	1回目	31.3	40.2	0.526	89.0	89.0
	2回目	40.1	31.4	0.595	88.1	98.6
	3回目	45.8	25.7	0.663	40.7	99.0

【0113】

(実施例8)

サイトエラ・コンプリカタ (*Saitoella complicata*) IF0 10748を培地(ペプトン5g、酵母エキス3g、マルトエキス3g、グルコース20g/L、pH6.0)で25℃、72時間好氣的に750L培養した。得られた菌体を、窒素ガスで密閉したラニー社製圧力式ホモジナイザーにより破碎圧力140MPaで2回破碎し、菌体破碎液を調製した。この菌体破碎液を、図1に示す向流3段連続抽出装置にて連続抽出を行った。攪拌槽の容量は630L、静置分離槽の容量は200Lとした。微生物菌体破碎液を第1段攪拌槽へ、イソプロパノールとn-ヘキサンを各段へ供給した。菌体破碎液の供給液量は2L/分、イソプロパノール及びn-ヘキサンの供給量は、各段への供給量を合計した総量として、イソプロ

パノール 1.3 L/分、n-ヘキサン 3.7 L/分とした。ただし、この際、各段の溶剤濃度は、イソプロパノール濃度 5~50 v/v%、n-ヘキサン濃度 25~65 v/v%の範囲となるように適宜調整した。抽出は温度 40℃で、処理時間は 6 時間とした。6 時間めの時点での、3 段めの静置分離槽の抽出残渣中に残る還元型補酵素 Q₁₀の量より、菌体破碎液から抽出された還元型補酵素 Q₁₀の回収率を計算したところ、98.9%となった。また、全運転期間を通じ、静置分離は良好に行われ、安定した抽出の連続操作が可能であった。

【0114】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、微生物細胞の培養、還元型補酵素 Q₁₀の回収という非常に簡便な操作によって、還元型補酵素 Q₁₀を工業規模で安価に製造することができ、また、酸化型補酵素 Q₁₀についても、簡便な操作により製造することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 還元型補酵素 Q_{10} 、及び、酸化型補酵素 Q_{10} を工業的規模で簡便に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 還元型補酵素 Q_{10} を全補酵素 Q_{10} の70%以上含有する微生物細胞を得、所望により前記細胞を破碎し、生産された還元型補酵素 Q_{10} を回収する還元型補酵素 Q_{10} の製造方法。また、前記微生物細胞又は、該細胞破碎液を酸化した後、生成した酸化型補酵素 Q_{10} を回収するか、或いは、前記微生物細胞又は、該細胞破碎液から還元型補酵素 Q_{10} を回収した後に酸化処理に付す、酸化型補酵素 Q_{10} の製造方法。

【選択図】 なし。

出願人履歴情報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日 1990年 8月27日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名 鐘淵化学工業株式会社